

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



574

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 31/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/67734</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. November 2000 (16.11.00)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03967</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2000 (03.05.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 21 567.7 11. Mai 1999 (11.05.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASFAK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBISCH, Wilfried [DE/DE]; Häuserstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). SADOWSKI, Jens [DE/DE]; Mainstrasse 2, D-67117 Lim- burgerhof (DE). KOCK, Michael [DE/DE]; Lillengasse 80, D-67105 Schifferstadt (DE). HÖGER, Thomas [DE/DE]; Rathenaustrasse 12, D-68535 Edingen-Neckarhausen (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03967</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2000 (03.05.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 21 567.7 11. Mai 1999 (11.05.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASFAK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBISCH, Wilfried [DE/DE]; Häuserstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). SADOWSKI, Jens [DE/DE]; Mainstrasse 2, D-67117 Lim- burgerhof (DE). KOCK, Michael [DE/DE]; Lillengasse 80, D-67105 Schifferstadt (DE). HÖGER, Thomas [DE/DE]; Rathenaustrasse 12, D-68535 Edingen-Neckarhausen (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03967</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2000 (03.05.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 21 567.7 11. Mai 1999 (11.05.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASFAK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBISCH, Wilfried [DE/DE]; Häuserstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). SADOWSKI, Jens [DE/DE]; Mainstrasse 2, D-67117 Lim- burgerhof (DE). KOCK, Michael [DE/DE]; Lillengasse 80, D-67105 Schifferstadt (DE). HÖGER, Thomas [DE/DE]; Rathenaustrasse 12, D-68535 Edingen-Neckarhausen (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: USE OF PHTHALAZINE DERIVATIVES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PHTHALAZINE-DERIVATEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of phthalazine derivatives as inhibitors of the enzyme poly(ADP-ribose)polymerase or PARP (EC 2.4.2.30), and to their use as inhibitors of PARP-homologous enzymes. These phthalazine derivatives also exhibit, in particular, a selective inhibition of the PARP-homologous enzymes.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phthalazin-Derivaten als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30), die Verwendung als Inhibitoren von PARP-homologen Enzymen und insbesondere zeigen diese Phthalazin-Derivate auch eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Phthalazine-Derivaten

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phthalazin-Derivaten als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30), die Verwendung als Inhibitoren von PARP-homologen Enzymen und insbesondere zeigen diese Phthalazin-

10 Derivate auch eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme.

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS) stellt ein regulatorisches Enzym dar, das in Zellkernen gefunden wird (K. Ikai et al.,

15 *J. Histochem. Cytochem.* 1983, 31, 1261-1264). Man nimmt an, daß PARP eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Brüchen spielt (M.S. Satoh et al., *Nature* 1992, 356, 356-358). Schädigungen oder Brüche der DNA-Stränge aktivieren das Enzym PARP, das, wenn es aktiviert ist, die Übertragung von ADP-Ribose aus NAD katalysiert

20 (S. Shaw, *Adv. Radiat. Biol.*, 1984, 11, 1-69). Dabei wird Nikotinamid aus NAD freigesetzt. Nikotinamid wird unter Verbrauch des Energieträgers ATP von anderen Enzymen wieder in NAD umgewandelt. Eine Überaktivierung von PARP hätte dementsprechend einen unphysiologisch hohen Verbrauch von ATP zur Folge und dies
25 führt im Extremfall zu Zellschädigungen und Zelltod.

Es ist bekannt, daß Radikale wie Superoxid-Anion, NO und Wasserstoffperoxid in Zellen zu DNA-Schädigungen führen können und damit PARP aktivieren. Die Bildung von großen Mengen an Radikalen

30 wird bei einer Reihe von pathophysiologischen Zuständen beobachtet und man geht davon aus, daß diese Anhäufung von Radikalen zu den beobachteten Zell- bzw Organschäden führen oder beitragen. Dazu zählt von zum Beispiel ischämische Zustände von Organen wie im Schlaganfall, Herzinfarkt (C. Thiernemann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 679-683) oder Ischämie der Nieren, aber
35 auch Reperfusionsschäden wie sie zum Beispiel nach der Lyse von Herzinfarkt auftreten (s. oben: C. Thiernemann et al.). Die Hemmung von dem Enzym PARP könnte demzufolge ein Mittel sein, um diese Schäden zum mindestens zum Teil zu verhindern oder abzumildern. PARP-Inhibitoren könnten somit ein neues Therapieprinzip zur Behandlung von eine Reihe von Krankheiten darstellen.

Das Enzym PARP beeinflusst die Reparatur von DNA-Schäden und könnte somit auch in der Therapie von Krebs-Erkrankungen eine
45 Rolle spielen, da in Kombination mit cytostatisch wirksamen Stoffen ein höheres Wirkpotential gegenüber Tumorgewebe beob-

achtet wurde (G. Chen et al. *Cancer Chemo. Pharmacol.* 1988, 22, 303).

Zudem wurde gefunden, daß PARP-Inhibitoren immunsuppressive Wirkung zeigen können (D. Weltin et al. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995, 17, 265-271).

Es wurde ebenfalls entdeckt, daß PARP bei immunologischen Erkrankungen bzw. Krankheiten, in denen das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis und septischer Schock, involviert ist, und daß PARP-Inhibitoren einen günstigen Effekt auf den Krankheitsverlauf zeigen können (H. Kröger et al. *Inflammation* 1996, 20, 203-215; W. Ehrlich et al. *Rheumatol. Int.* 1995, 15, 171-172; C. Szabo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3867-3872; S. Cuzzocrea et al. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 342, 67-76).

Weiterhin zeigte der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid protektive Effekte in einem Model für den Kreislaufschock (S. Cuzzocrea et al., *Br. J. Pharmacol.* 1997, 121, 1065-1074).

Ebenfalls gibt es experimentelle Hinweise, daß Inhibitoren des Enzymes PARP als Mittel zur Behandlung von Diabetes mellitus nützlich sein könnten (V. Burkart et al. *Nature Med.* 1999, 5, 314-319).

Phthalazine und deren Derivate stellen eine vielbenutzte Stoffklasse dar. 2H-Phthalazin-1-one, die zudem in 4-Stellung Substituenten tragen, sind jedoch bisher weniger beschrieben worden. So sind Methylenamide, Methylenharnstoffe und Methylenimide in Puodzhyunas et al. *Pharm. Chem. J.* 1973, 7, 566; W. Mazkanowa et al., *Zh. Obshch. Khim.* 1958, 28, 2822 und in F.K. Mohamed et al., *Ind. J. Chem. B*, 1994, 33, 769 dargestellt worden. Zyklische Amine und Alkylamine, wobei die Aminogruppe sowohl eine zyklische als auch ein aliphatisches Amin sein kann, sind in J. Singh et al., *Ind. J. Chem. B*, 1983, 22, 1083; Y. Egushi et al., *Chem Pharm. Bull.* 1991, 9, 1846 und in Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku, 1998, 12, 41 (CA 91, 91579) beschrieben worden, wobei allerdings die Verbindungen auf antiatherosklerotische Wirkung, auf Hemmung der Blutplättchenaggregation oder auf Blutdrucksenkung untersucht wurden. In WO 99/11649 sind in Phthalazinone erwähnt, die in 4-Stellung Phenylpiperazinylmethyl-Reste tragen und die als Inhibitoren des Enzymes PARP beschrieben wurden.

In A.M. Bernard et al., Synthesis 1998, 317 sind 2H-Phthalazin-one, in 4-Stellung Phenoxymethyl-Derivate tragen, hergestellt worden.

- 5 In der vorliegenden Erfindung werden neue Phthalazin-Derivate der allgemeinen Formeln I beschrieben, die überraschenderweise PARP-Inhibitoren darstellen.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, daß diese Verbindungen
10 der allgemeinen Formel I auch PARP-homologe Enzyme hemmen. Zudem zeigen diese Verbindungen überraschenderweise eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme d.h. die Verbindungen hemmen die homologen Enzyme stärker als das Enzym PARP selbst.

- 15 Die erfindungsgemäßen Phthalazine weisen gegenüber PARP-Homologen (PARP 2) eine bevorzugt 5-fach stärkere inhibitorische Wirkung auf als gegenüber dem bekannten PARP (PARP 1).

Unter PARP-Homologen wird insbesondere das Homologe PARP-2 gemäß
20 WO 99/64572 (human PARP2) verstanden. Dies läßt sich vorteilhafterweise aus dem menschlichen Hirn, Herz, skelettmuskel, Niere und Leber isolieren. In anderen Geweben oder Organen ist human-PARP2 deutlich schwächer exprimiert.

- 25 Insbesondere das aus menschlichem Hirn isolierbare humanPARP2 und dessen funktionale Äquivalente sind bevorzugte Agenzien für die Entwicklung von Inhibitoren gegen Schlaganfall. Es kann nämlich angenommen werden, daß die Wirkstoffentwicklung, basierend auf PARP2 als Indikator, die Entwicklung von Inhibitoren ermöglicht,
30 welche für die Anwendung an menschlichem Gehirn optimiert sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auf Basis von PARP2 entwickelte Inhibitoren auch zur Therapie von PARP-vermittelter pathologischer Zustände anderer Organe einsetzbar sind. Anhand der Gewebeverteilung der erfindungsgemäßen Proteine sind vor
35 allem Indikationen von Interesse, die auf ischämischen Zuständen entsprechender Organe beruhen (Ischämie der Hirns (Schlaganfall), der Herzens (Herzinfarkt), Schädigungen, die während oder nach der Infarktlyse (z.B. mit TPA, Reteplase oder mechanisch mit Laser oder Rotoblator) und von Mikroinfarkten während und nach
40 Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen, der Niere (akuten Nierenversagen, akute Niereninsuffizienz oder Schädigungen während und nach einer Nierentransplantation), Schädigung der Leber oder der Skelettmuskulatur). Ferner sind Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Erkrankungen
45 denkbar, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirn-Trauma), Massenblutung, Subarachnoidal-Blutungen und Schlaganfall auftreten, sowie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie multipler Infarkt-

Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie z.B. Petit mal, und tonisch-clonischen Anfällen und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lope, und komplex-partiellen Anfällen. Ferner können besagte Proteine relevant sein bei der Behandlung einer Revaskularisation kritisch verengter Koronararterien und kritisch verengter peripherer Arterien, z.B. Beinarterien. Darüber hinaus können besagte Proteine eine Rolle spielen bei der Chemotherapie von Tumoren und bei der Verhinderung von Metastasierungen sowie bei der Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, z.B. der rheumatischen Arthritis. Weitere pathologische Zustände dieser und anderer Organe sind denkbar.

- 15 Ähnlich wie PARP1 wird auch PARP2 durch geschädigte DNA, wenn auch durch einen vermutlich anderen Mechanismus aktiviert. Eine Bedeutung in der DNA-Reparatur ist denkbar. Die Blockade der erfindungsgemäßen PARPs würde auch in Indikationen, wie Krebs, von Nutzen sein (z.B. in der Radiosensitisierung von Tumorpationen).

Unter Verwendung der oben beschriebenen spezifischen Assay-Systeme für Bindungspartner von PARP1 und PARP2 wurden aktive und selektive Inhibitoren gegen die erfindungsgemäßen Proteine entwickelt.

- Erfindungsgemäß bereitgestellte Inhibitoren besitzt gegenüber PARP2 eine stark ausgeprägte inhibitorische Aktivität. Die K_i -Werte können dabei weniger als etwa 1000 nM, wie z.B. weniger als etwa 700 nM, weniger als etwa 100 nM und weniger als etwa 30 nM, wie z.B. etwa 1 bis 20 nM, betragen.

- Erfindungsgemäß bevorzugte Inhibitoren besitzen eine überraschend ausgeprägte Selektivität für PARP2. Das Verhältnis K_i (PARP1): K_i (PARP2) für erfindungsgemäße Inhibitoren ist nämlich z.B. größer als 5. Eine weitere Gruppe von Inhibitoren wurde so entwickelt, daß sie PARP1 und PARP2 gleichzeitig inhibieren.

- Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Trans-

5

posons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

5 Expression der Konstrukte

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate oder des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z.B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z.B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen λ , μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bilden ein Expressionssystem. Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme beispielsweise die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA 5 zu programmieren.

Herstellung von Antikörpern:

Die Herstellung von Anti-PARP2-Antikörpern erfolgt in einer dem 10 Fachmann geläufigen Weise. Mit Antikörpern sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, ebenso wie Antikörperfragmente, wie Fv, Fab und (Fab)'₂. Geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. 15 beschrieben in Campbell, A.M., Monoclonal Antibody Technology, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Dübel, S., Rekombinante Antikörper (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

20 Beispiel A: Isolierung der PARP2-cDNA

Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, # HL3002a, Fa. Clontech) wurden die vorliegenden cDNA-Sequenzen 25 erstmalig gefunden. Die Sequenz dieses Klons ist in SEQ ID NO:1 beschrieben.

Beispiel B: Herstellung der Enzyme

30 Humanes PARP1 wurde zum Vergleich rekombinant im Baculovirus-System in der dem Fachmann geläufigen Weise exprimiert und wie beschrieben (Shah et al., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13) partiell aufgereinigt. Rinder PARP1 in einer 30-50%igen Reinheit ($c = 0,22$ mg/ml, spez. Aktivität 170 nmol ADP-ribose/ 35 min/mg Gesamtprotein bei 25°C) wurde von BIOMOL (Best.-Nr. SE-165) bezogen. Humanes PARP2 wurden rekombinant im Baculovirus-System (Bac-to-Bac System, BRL LifeScience) exprimiert. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs in den pFASTBAC-1-Vektor kloniert. Nach Herstellung von rekombinanter Baculovirus-DNA durch Rekombination in 40 E. coli, erfolgte Transfektion von Insektenzellen (Sf9 oder High-Five) mit den entsprechenden rekombinanten Baculovirus-DNAs. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Virenstämme wurden in der dem Fachmann geläufigen Weise amplifiziert. Größere Mengen rekombinanter 45 Proteine wurden durch Infektion von 500 ml Insektenzellkultur (2×10^6 Zellen/ml) mit Viren in einer MOI (multiplicity of infection; Verhältnis von Viren zu Zellen) von 5-10 infiziert

und 3 bis 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Proteine aus dem Pellet aufgereinigt.

- 5 Die Aufreinigung erfolgte durch klassische, dem Fachmann geläufige Methoden der Proteinreinigung unter Detektion der Enzyme mit entsprechenden spezifischen Antikörpern. Teilweise wurden die Proteine auch über eine 3-Aminobenzamid/Affinitäts-säule wie beschrieben (Burtscher et al., Anal Biochem 1986, 152:285-290) affinitätsgereinigt. Die Reinheit betrug >90%.

Beispiel C: Testsysteme für die Bestimmung der von Aktivität von PARP2 und der Inhibitorischen Wirkung von Effektoren auf PARP1 und PARP2

15

- a) Herstellung von Antikörpern gegen Poly-(ADP-ribose)

- Als Antigen zur Generierung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern kann Poly-(ADP-ribose) verwendet werden. Die Herstellung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern ist in der Literatur beschrieben. (Kanai Y et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306; Kawamatsu H et al. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) Immunology 34, 501-508).

- 25 Unter anderem wurden verwendet: Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (polyklonales Antiserum, Kaninchen), BIOMOL; Best.-Nr. SA-276. Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (monoklonal, Maus; Klon 10H; Hybri-omaüberstand, affinitätsgereinigt).

- 30 Die Antiseren oder aus Hybridomakulturüberstand gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden durch eine Protein-A-Affinitätschromatographie in der dem Fachmann geläufigen Weise aufgereinigt.

- 35 b) ELISA-Assay

Materialien:

ELISA Farbreagenz: TMB-Fertigmix SIGMA T-8540

40

Eine 96-well Mikrotiterplatte (FALCON Micro-Test IIIä Flexible Assay Plate, # 3912) wurde mit Histonen (SIGMA, H-7755) beschichtet. Histone wurden hierfür in Carbonatpuffer (0.05M Na₂HCO₃; pH 9.4) in einer Konzentration von 50 µg/ml gelöst. Die einzelnen

- 45 Wells der Mikrotiterplatte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit je 150 µl dieser Histon-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Wells durch Zugabe von

150 µl einer 1%igen BSA-Lösung (SIGMA, A-7888) in Carbonatpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgen drei Waschschriffe mit Waschpuffer (0,05 % Tween10 in 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline; Gibco, Best.-Nr. 10010): 0,21 g/l KH_2PO_4 , 9 g/l NaCl, 0,726 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4). Waschschriffe wurden durchweg mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt (Mikrotiterplatten-Wäscher "Columbus", SLT-Lab-instruments, Österreich).

10 Für die Enzymreaktion wurden eine Enzymreaktionslösung und eine Substratlösung jeweils als "Pre-Mix" benötigt. Die absolute Menge dieser Lösungen richtete sich nach der Anzahl der vorgesehenen Test-Well.

15 Zusammensetzung der Enzymreaktionslösung pro Well:

- 4 µl PARP-Reaktionspuffer (1M Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl_2 , 10 mM DTT)
- 20 ng PARP1 (human oder bovin) oder 8 ng PARP2 (Human)
- 4 µl aktivierte DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)

20 - ad 40 µl H_2O

Zusammensetzung der Substrat-Lösung pro Well:

- 5 µl PARP-Reaktionspuffer (10x)
- 0,8 µl NAD-Lösung (10 mM, SIGMA N-1511)

25 - 44 µl H_2O

Inhibitoren wurden in 1x PARP-Reaktionspuffer gelöst. DMSO, daß gelegentlich zum Lösen von Inhibitoren in höheren Konzentrationen verwendet wurde, war bis zu einer Endkonzentration von 2 %

30 unproblematisch. Für die Enzymreaktion wurden 40 µl der Enzymreaktionslösung pro Well vorgelegt und mit 10 µl Inhibitor-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl Substrat-Lösung pro Well gestartet. Die Reaktion wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und

35 anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer gestoppt.

Als primäre Antikörper wurden spezifische Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Antikörper-Puffer (1 % BSA in PBS; 0,05 % Tween20).

40 Die Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente, Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim.

45 Best.-Nr. 1500.686; Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA, Best.-Nr. A-6154) in einer 1:10000 Verdünnung in Antikörperpuffer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die

Farbreaktion unter Verwendung von 100 µl Farbreagens (TMB-Fertigmix, SIGMA) pro Well für ca. 15 min. bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2M H₂SO₄ gestoppt. Danach wurde sofort im ELISA-Platten-Lesegerät ("Easy Reader" 5 EAR340AT, SLT-Labinstruments, Österreich) gemessen (450nm gegen 620nm). Das Messprinzip ist schematisch in Figur 6 dargestellt.

Für die Ermittlung des K_i-Wertes eines Inhibitors wurden verschiedene Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve herangezogen. Für eine bestimmte Inhibitorkonzentration werden 3fach-Werte erhoben. Arithmetische Mittelwerte werden mit Microsoft® Excel ermittelt. Die IC₅₀-Bestimmung erfolgt mit der Microcal® Origin Software (Vers. 5.0) ("Sigmoidal Fit"). Umrechnung der so berechneten IC₅₀-Werte auf K_i-Werte erfolgte durch 10 Verwendung von "Eich-Inhibitoren". Die "Eich-Inhibitoren" wurden bei jeder Analyse mitgemessen. Der K_i-Werte der "Eich-Inhibitoren" wurde im gleichen Testsystem durch Dixon-Diagramm Analyse in der dem Fachmann geläufigen Weise ermittelt. 15

20 c) HTRF-(Homogenous time-resolved fluorescence) Assay

Beim erfindungsgemäßen HTRF-PARP-Assay werden Histone als Zielproteine der Modifikation durch PARP indirekt mit einem XL665-Fluorophor markiert. Der Antikörper wird direkt mit einem 25 Europium-Kryptat markiert. Befindet sich das XL665-Fluorophor in einer unmittelbaren räumlichen Nähe, die durch eine Bindung an die Poly-(ADP-ribose) am Histon gewährleistet wird, dann ist eine Energieübertragung möglich. Die Emission bei 665 nm ist somit direkt proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper, der 30 wiederum der Poly-(ADP-ribose) Menge entspricht. Somit entspricht das gemessene Signal der PARP Aktivität. Das Meßprinzip ist schematisch in Figur 7 dargestellt. Die verwendeten Materialien sind, wenn nicht ausdrücklich angegeben, identisch mit denen im ELISA Assay (s.o.) verwendeten.

35

Histone wurden in Hepes-Puffer (50 mM, pH = 7,5) zu 3 mg/ml gelöst. Biotinylierung erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, #21335T). Ein molares Verhältnis von 4 Biotin pro Histon wurde verwendet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten (RT). Anschließend wurden die biotinylierten Histone über eine G25 SF HR10/10 Säule (Pharmacia, 17-0591-01) in Hepes Puffer (50 mM, pH = 7,0) aufgereinigt, um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper wurde mittels bifunktionaler Kopplungsreagenzien mit Europium-Kryptat markiert 40 (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622). Die Reinigung erfolgte auf einer G25SF HR10/30 Säule. Ein molares Verhältnis von 3.1 Kryptaten pro Antikörper wurde

10

erzielt. Die Ausbeute betrug 25 %. Die Konjugate wurden in Gegenwart von 0,1 % BSA in Phosphatpuffer (0,1 M, pH = 7) bei -80°C gelagert.

5 Für die Enzymreaktion wurden pro Well zusammenpipettiert:

- 10 µl PARP-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit 20 ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human)
- 10 µl aktivierte DNA in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 µg/ml)
- 10 - 10 µl biotinylierte Histone in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (1,25 µM)
- 10 µl Inhibitor in PARP-HTRF-Reaktionspuffer

Diese Reagenzien wurden 2 Minuten vorinkubiert, bevor die

15 Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl NAD-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (400 µM/ml) gestartet wurde. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

20 Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl PARP-Inhibitor (25 µM, K_i=10nM) in "Revelation"-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2M KF, 0,05 % BSA) gestoppt.

25 Danach wurden zugegeben:

- 10 µl EDTA-Lösung (SIGMA, E-7889, 0,5M in H₂O)
- 100 µl Sa-XL665 (Packard Instruments) in "Revelation"-Puffer (15-31,25nM)
- 30 - 50 µl Anti-PARP-Kryptat in "Revelation"-Puffer (1,6-3,3nM).

Nach 30 Minuten (bis 4 Stunden) konnte dann gemessen werden. Die Messung erfolgte auf einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments). Die Berechnung der K_i-Werte erfolgte wie

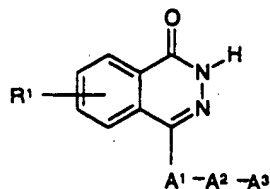
35 beim ELISA Assay beschrieben.

40

45

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von substituierten Phthalazine der allgemeinen Formel I

5



(I)

10 worin

- R^1 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, OH, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{11}R^{12}$, $NH-CO-R^{13}$, $O-C_1-C_4$ -Alkyl, wobei R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander
- 15 Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten und R^{13} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl oder Phenyl bedeuten, und
- A^1 einen geradkettigen oder verzweigten C_0 - C_6 -Alkylrest und
- 20 A^2 NR^2 , $NR^2-C_1-C_6$ -Alkyl-, O und S und
- R^2 Wasserstoff und C_1 - C_6 -Alkyl und
- A^3 einen aromatischen oder heteroaromatischen ein oder zweigliedrigen Ring mit je 5 oder 6 Ringatomen und bis zu
- 25 3 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O, S, wie zum Beispiel Phenyl, Thiophen, Pyridin, Pyrimidin, Naphthalin, Indol, Imidazol, die noch mit R^4 und einem oder zwei R^3 substituiert sein können, wobei R^3 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod,
- 30 verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, OH, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{11}R^{12}$, $SO_2NR^{11}R^{12}$, $SO_2-C_1-C_4$ -Alkyl, $S-C_1-C_4$ -Alkyl, O-Ph, O- CF_3 , $NH-CO-R^{13}$, $O-C_1-C_4$ -Alkyl, wobei R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten und R^{13} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl oder Phenyl bedeuten
- 35 kann,
- R^4 Wasserstoff, $(X)_{0,1}-C_1-C_4$ -Alkyl- $NR^{41}R^{42}$, wobei $X = O, S$ und NR^{43} und R^{41} und R^{42} unabhängig voneinander Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl und ein cyclisches Amin von 3
- 40 bis 7 Gliedern sein kann und R^{43} Wasserstoff und C_1 - C_4 -Alkyl sein kann,

sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, und deren Prodrugs.

45

12

Die Verbindungen der Formel I können als Racemate, als enantiomerenreine Verbindungen oder als Diastereomere eingesetzt werden. Werden enantiomerereine Verbindungen gewünscht, kann man diese beispielweise dadurch erhalten, daß man mit einer geeigneten
5 optisch aktiven Base oder Säure eine klassische Racematspaltung mit den Verbindungen der Formel I oder ihren Zwischenprodukten durchführt.

Gegenstand der Erfindung sind auch zu Verbindungen der Formel I
10 mesomere oder tautomere Verbindungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die physiologisch verträglichen Salze der Verbindungen I, die sich durch Umsatz von Verbindungen I mit einer geeigneten Säure oder Base erhalten
15 lassen. Geeignete Säuren und Basen sind zum Beispiel in Fortschritte der Arzneimittelforschung, 1966, Birkhäuser Verlag, Bd. 10, S. 224-285, aufgelistet. Dazu zählen zum Beispiel Salzsäure, Citronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumar-
20 säure usw. bzw. Natriumhydroxid, Lithiumhydroxid, Kaliumhydroxid und Tris.

Unter Prodrugs werden solche Verbindungen verstanden, die *in vivo* in Verbindungen der allgemeinen Formel I metabolisiert werden.
25 Typische Prodrugs sind Phosphate, Carbamate von Aminosäuren, Ester und andere.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Phthalazin-Derivate I kann auf verschiedenen Wegen, die in der Literatur bereits durchgeführt
30 wurden, erfolgen.

Die möglichen Synthesemethoden sind zum Beispiel in Puodzhyunas et al. Pharm. Chem. J. 1973, 7, 566, W. Mazkanowa et al., Zh. Obshch. Khim. 1958, 28, 2822, F.K. Mohamed et al., Ind. J.
35 Chem. B, 1994, 33, 769, J. Singh et al., Ind. J. Chem. B, 1983, 22, 1083, Y. Egushi et al., Chem Pharm. Bull. 1991, 9, 1846 und in Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku, 1998, 12, 41 (CA 91, 91579) beschrieben oder dort zitiert worden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können analog der dort beschriebenen Methoden
40 hergestellt werden.

Die in der vorliegenden Erfindung enthaltenen substituierten Phthalazine I stellen Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)-polymerase dar und zeigen insbesondere Selektivität für neue
45 PARP-homologe Enzyme.

Die inhibitorische Wirkung der substituierten Phthalazin-Derivate I wurde mit einem in der Literatur bereits bekannten Enzymtest ermittelt, wobei als Wirkmaßstab ein K_I -Wert ermittelt wurde. Die Phthalazin-Derivate I wurden in dieser Weise auf

5 Hemmwirkung des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30) gemessen.

Das 4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)methyl-2H-phthalazin-1-on wurde in WO 99/11649 als PARP-Inhibitor beschrieben und ist den

10 erfindungsgemäßen Verbindungen strukturell verwandt. Diese Verbindung wurde im angegebenen HTRF-Assay auf die Hemmwirkung von PARP 1 untersucht. Dabei zeigte diese Verbindung jedoch nur schwache Wirkung (bei 10 μM 38 % Hemmung).

15 Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht nur auch PARP-Enzyme hemmen, sondern deutlich wirksamer sind (siehe Tabelle).

	Bsp.	PARP1 $K_I/\mu\text{M}$
20	1	0,62
	4	0,19
	11	1,80
25	16	0,78
	17	0,74
	18	0,69

Die substituierten Phthalazin-Derivate der allgemeinen Formeln I

30 stellen Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS) dar und können somit zur Behandlung und Prophylaxe von Krankheiten, die mit einer erhöhten Enzymaktivität dieser Enzyme verbunden sind, dienen.

35 Die Verbindungen der Formeln I können zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen nach Ischämien und zur Prophylaxe bei erwarteten Ischämien verschiedener Organe eingesetzt werden.

40 Die vorliegenden Phthalazin-Derivate der allgemeinen Formel I können danach zur Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Krankheiten, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirntrauma), Massenblutungen, Subarachnoidal-Blutungen und Stroke auftreten,

45 und von neurodegenerativen Krankheiten wie multipler Infarkt-Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen

- Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische Anfälle und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lope, und komplex-partiellen Anfällen, und weiterhin zur Behandlung und Prophylaxe von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien und Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien, zum Beispiel der akuten Niereninsuffizienz, des akuten Nierenversagens oder von Schädigungen, die während und nach einer Nierentransplantation auftreten, dienen. Weiterhin können die Verbindungen der allgemeinen Formeln I zur Behandlung des akuten Myocardinfarkts und Schädigungen, die während und nach dessen medikamentöser Lyse auftreten (zum Beispiel mit TPA, Reteplase, Streptokinase oder mechanisch mit einem Laser oder Rotablator) und von Mikroinfarkten während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen dienen. Ebenfalls können die vorliegenden Phthalazine I zur Behandlung einer Revascularisation kritisch verengter Koronararterien, zum Beispiel bei der PCTA und Bypass-Operationen, und kritisch verengter peripherer Arterien, zum Beispiel Beinarterien, dienen. Zudem können die Phthalazine I bei der Chemotherapie von Tumoren und deren Metastasierung nützlich sein und zur Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, wie z.B. rheumatischer Arthritis und auch zur Behandlung von Diabetes mellitus dienen.

- Die erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen enthalten neben den üblichen Arzneimittel-hilfstoffen eine therapeutisch wirksame Menge der Verbindungen I.

- Für die lokale äußere Anwendung, zum Beispiel in Puder, Salben oder Sprays, können die Wirkstoffe in den üblichen Konzentrationen enthalten sein. In der Regel sind die Wirkstoffe in einer Menge von 0,001 bis 1 Gew.-%, vorzugsweise 0,001 bis 0,1 Gew.-% enthalten.

- Bei der inneren Anwendung werden die Präparationen in Einzeldosen verabreicht. In einer Einzeldosis werden pro kg Körpergewicht 0,1 bis 100 mg gegeben. Die Zubereitung können täglich in einer oder mehreren Dosierungen je nach Art und Schwere der Erkrankungen verabreicht werden.

- Entsprechend der gewünschten Applikationsart enthalten die erfindungsgemäßen Arznei-mittelzubereitungen neben dem Wirkstoff die üblichen Trägerstoffe und Verdünnungsmittel. Für die lokale äußere Anwendung können pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, wie Ethanol, Isopropanol, oxethyliertes Ricinusöl, oxethyliertes Hydriertes Ricinusöl, Polyacrylsäure, Polyethylenglykol, Polyethylenglykostearyl, ethoxylierte Fettalkohole, Paraffinöl, Vaseline und Wollfett, verwendet werden. Für die innere Anwendung

15

eignen sich zum Beispiel Milchzucker, Propylenglykol, Ethanol, Stärke, Talk und Polyvinylpyrrolidon.

Ferner können Antioxidationsmittel wie Tocopherol und butyliertes
5 Hydroxyanisol sowie butyliertes Hydroxytoluol, geschmacks-
verbessernde Zusatzstoffe, Stabilisierungs-, Emulgier- und
Gleitmittel enthalten sein.

Die neben dem Wirkstoff in der Zubereitung enthaltenen Stoffe
10 sowie die bei der Herstellung der pharmazeutischen Zubereitungen
verwendeten Stoffe sind toxikologisch unbedenklich und mit dem
jeweiligen Wirkstoff verträglich. Die Herstellung der Arznei-
mittelzubereitungen erfolgt in üblicher Weise, zum Beispiel durch
Vermischung des Wirkstoffes mit anderen üblichen Trägerstoffen
15 und Verdünnungsmitteln.

Die Arzneimittelzubereitungen können in verschiedenen Appli-
kationsweisen verabreicht werden, zum Beispiel peroral, parenteral
wie intravenös durch Infusion, subkutan, intraperitoneal und
20 topisch. So sind Zubereitungsformen wie Tabletten, Emulsionen,
Infusions- und Injektionslösungen, Pasten, Salben, Gele, Cremes,
Lotionen, Puder und Sprays möglich.

Beispiele

25

Beispiel 1

4(N(4-Hydroxyphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,4 (2H), 5,5 (1H), 6,55 (4H),
30 7,75-8,3 (4H), 8,5 (1H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

Beispiel 2

4(N(4-N,N-Dimethylsulfamoyl)phenyl-aminomethyl)-2H-phthalazin-
1-on

35

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2,5 (6H), 4,7 (2H), 6,8 (2H), 7,2 (1H),
7,5 (2H), 7,75-8,3 (4H), und ca. 12,5 (1H) ppm.

Beispiel 3

40 4(N(4-Chlorphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 6,4 (1H), 6,75 (2H), 7,1 (2H),
7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

45

16

Beispiel 4

4(N-Phenyl)-aminomethyl-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 6,3 (1H), 6,2 (1H), 6,8 (2H), 7,1 (2H), 7,9-8,5 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 5

4(N(3-Trifluormethyl-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

10 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 6,7 (1H), 6,8 (1), 7,0 (2H), 7,3 (1H), 7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 6

4(N(2-Cyanophenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

15

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,8 (2H), 6,7 (2H), 7,1 (1H), 7,5-7,8 (2H), 7,95 (1H), 8,1 (1H), 8,4 (2H) und 12,5 (1H) ppm.

Beispiel 7

20 4(N(4-Methoxyphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 3,7 (3H), 4,5 (2H), 5,8 (1H), 6,7 (4H), 7,9-8,3 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

25 Beispiel 8

4(N(2,4-Dichlorphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,8 (2H), 6,3 (1H), 7,0 (1H), 7,2 (1H), 7,4 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,3 (2H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

30

Beispiel 9

4(N(4-Nitrophenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

35 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,8 (2H), 6,8 (2H), 7,8-8,4 (7H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 10

4-(N(3-Methylmercapto-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

40 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2,4 (3H), 4,6 (2H), 6,3 (1H), 6,4-6,7 (3H), 7,0 (1H), 7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 11

4(N(2,4-Difluor-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

45

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,7 (2H), 6,0 (1H), 7,0 (2H), 7,1 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,3 (2H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 12

4(N(4-Phenoxy-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 6,2 (1H), 6,8 (2H), 6,9 (3H), 7,1 (1H), 7,4 (2H), 8,0-8,5 (4H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

Beispiel 13

4(N(4-Trifluormethoxy-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

10 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 6,5 (1H), 6,75 (2H), 7,1 (2H), 7,8-8,4 (4H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

Beispiel 14

4(N(4-Trifluormethyl-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

15

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,7 (2H), 6,8 (2H), 6,95 (1H), 7,4 (2H), 7,8-8,4 (4H) und 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 15

20 4(N-Methyl-N-phenyl-aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on x HCl

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2,7 (1,5H), 3,0 (1,5H), 3,8 (0,5H), 4,0 (0,5H), 4,5 (1H), 4,9 (1H), 6,5-8,3 (9H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

25

Beispiel 16

4(S(4-Chlorphenyl)mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

30 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,6 (2H), 7,4 (4H), 7,9-8,5 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 17

4(S(1-Methyl-imidazol-2-yl)mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

35 Beispiel 18

4(N(5-Methylmercapto-1,3,4-triazol-2-yl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

40 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2,4 (3H), 4,7 (2H), 7,1 (1H), 7,8-8,3 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

Beispiel 19

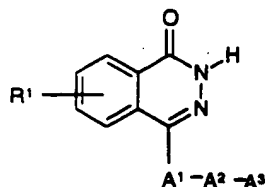
4(S(2-Pyridyl)-mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

45 ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 4,8 (2H), 7,2 (1H), 7,4 (1H), 7,7 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,2 (1H), 8,5 (1H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

Patentansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der Formel I

5



(I)

10

worin

- 15 R^1 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, OH, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{11}R^{12}$, $NH-CO-R^{13}$, $O-C_1-C_4$ -Alkyl, wobei R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten und R^{13} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl oder Phenyl
- 20 bedeuten, und
- A^1 einen geradkettigen oder verzweigten C_0 - C_6 -Alkylrest und
- A^2 NR^2 , $NR^2-C_1-C_6$ -Alkyl-, O und S und
- 25 R^2 Wasserstoff und C_1 - C_6 -Alkyl und
- A^3 einen aromatischen oder heteroaromatischen ein oder zweigliedrigen Ring mit je 5 oder 6 Ringatomen und bis zu
- 30 3 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O, S, die noch mit R^4 und einem oder zwei R^3 substituiert sein können, wobei R^3 Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und unverzweigtes C_1 - C_6 -Alkyl, OH, Nitro, CF_3 , CN, $NR^{11}R^{12}$, $SO_2NR^{11}R^{12}$, $SO_2-C_1-C_4$ -Alkyl, $S-C_1-C_4$ -Alkyl, O-Ph, O- CF_3 , $NH-CO-R^{13}$, $O-C_1-C_4$ -Alkyl, wobei R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_4 -Alkyl bedeuten und R^{13} Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl oder Phenyl
- 35 bedeuten kann,
- R^4 Wasserstoff, $(X)_{0,1}-C_1-C_4$ -Alkyl- $NR^{41}R^{42}$, wobei $X = O, S$ und NR^{43} und R^{41} und R^{42} unabhängig voneinander Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_4 -Alkyl-Phenyl und ein cyclisches Amin von 3 bis 7 Gliedern sein kann und R^{43} Wasserstoff und
- 40 C_1 - C_4 -Alkyl sein kann,

45

- sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, und deren Prodrugs zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen mit einer erhöhten Aktivität von Poly(ADP-ribose)transferase (PARP).
- 5
2. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 als Inhibitoren von PARP- bzw. PARS-homologen Enzymen.
- 10 3. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 als Inhibitoren von PARP- bzw. PARS-homologen Enzymen, wobei die Verbindungen diese Homologen im Vergleich zum PARP bzw. PARS selbst selektiv hemmen.
- 15 4. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung von solchen neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen, die durch Ischämie, Trauma oder Massenblutungen ausgelöst werden.
- 25 6. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung des Schlaganfalls und des Schädel-Hirntraumas.
7. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit der Parkinsonsche Krankheit und der Huntington-Krankheit.
- 30 8. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Prophylaxe von Schädigungen durch Ischämien.
- 35 9. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische Anfälle und partiell epileptischen
- 40 Anfällen, wie Temporal Lope, und komplex-partiellen Anfällen.
10. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien
- 45 und zur Behandlung während und nach Nierentransplantationen.

11. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien.
5
12. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Mikroinfarkten wie zum Beispiel während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen.
10
13. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung bei einer Revascularisation kritischer verengter Koronararterien wie zum Beispiel bei PTCA und Bypass-Operationen oder kritisch verengter peripherer Arterien, insbesondere Beinarterien.
15
14. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung des akuten Myocardinfarktes und von Schädigungen während und nach dessen medikamentöser oder mechanischer Lyse.
20
- 25 15. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Tumoren und deren Metastasierung.
16. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Sepsis und des septischen Schocks.
30
17. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von immunologischen Krankheiten wie Entzündungen und rheumatische Erkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis.
35
18. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Diabetes mellitus.
40
19. Verwendung von Verbindungen, die PARP2 mindestens 5fach stärker inhibieren als PARP1 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die durch eine selektive PARP2-Inhibierung gehindert oder geheilt werden.
45